

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005年9月29日 (29.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/090565 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09, C12Q 1/68, G01N 37/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/005612

(22) 国際出願日: 2005年3月18日 (18.03.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-081034 2004年3月19日 (19.03.2004) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 東洋紡績株式会社 (TOYOB CO., LTD.) [JP/JP]; 〒530-8230 大阪府 大阪市 北区堂島浜二丁目2番8号 Osaka (JP). 日本碍子株式会社 (NGK INSULATORS, LTD.) [JP/JP]; 〒467-8530 愛知県 名古屋市 瑞穂区須田町2-56 Aichi (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 川瀬 三雄 (KAWASE,Mitsuo) [JP/JP]; 〒467-8530 愛知県 名古屋市 瑞穂区須田町2-56 日本碍子株式会社内 Aichi (JP). 吉田 安子 (YOSHIDA,Yasuko) [JP/JP]; 〒467-8530 愛知県 名古屋市 瑞穂区須田町2-56 日本碍子株式会社内 Aichi (JP). 山田 和成 (YAMADA,Kazunari) [JP/JP]; 〒467-8530 愛知県 名古屋市 瑞穂区須田町2-56 日本碍子株式会社内 Aichi (JP). 宝田 裕 (TAKARADA,Yutaka) [JP/JP]; 〒914-0047 福井県 敦賀市 東洋町10番24号 東洋紡績株式会社 敦賀バイオ研究所内 Fukui (JP). 橋本 幸蔵 (HASHIMOTO,Kouzo) [JP/JP]; 〒530-8230 大阪府 大阪市 北区堂島浜二丁目2番8号 東洋紡績株式会社内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA,Toshio); 〒107-0062 東京都 港区 南青山6丁目11番1号 スリーエフ南青山ビルディング7F Tokyo (JP).

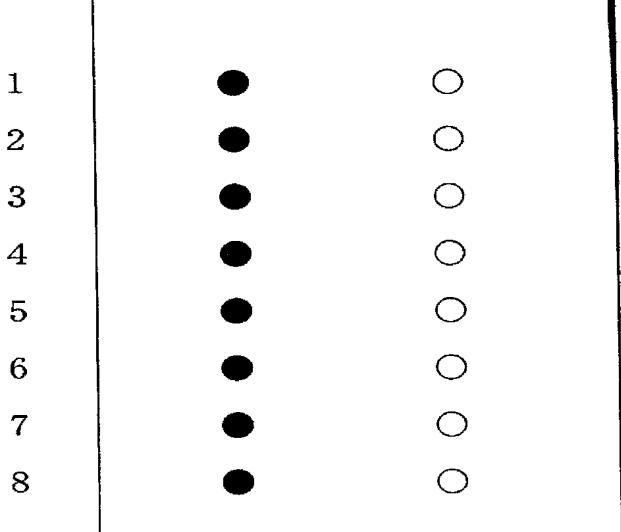
/続葉有/

(54) Title: DNA ARRAY AND METHOD OF DETECTING SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM

(54) 発明の名称: DNAアレイと一塩基多型の検出方法

A 第1プローブ B 第2プローブ

スポット ポット



A FIRST PROBE SPOT
B SECOND PROBE SPOT

(57) Abstract: A DNA array for detecting a single nucleotide polymorphism (SNP) in a gene having first probe spots, which comprise one or more spots wherein a sequence part hybridizable with a gene polynucleotide is exactly complementary to a first polymorphism mode of the gene, and second probe spots, which comprise one or more spots wherein the sequence part is exactly complementary to a second polymorphism mode of the gene, on a solid support. The probe spots constituting the first probe spots and the second probe spots differ in length from spot to spot. This DNA array makes it possible to more exactly detect an SNP.

(57) 要約: 遺伝子の一塩基多型を検出するためのDNAアレイであって、遺伝子ポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列部分が遺伝子の第1の多型形態に正確に相補的である1以上のプローブからなる第1のプローブスポット群と、同配列部分が遺伝子の第2の多型形態に正確に相補的である1以上のプローブからなる第2のプローブスポット群とを固相基体上に有し、第1プローブスポット群と第2プローブスポット群のそれぞれを構成するプローブスポットは、プローブスポット毎にプローブの長さが異なる。このDNAアレイは、より正確なSNP検出を可能とする。

WO 2005/090565 A1



- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,

BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

DNA アレイと一塩基多型の検出方法

5

技術分野

この出願の発明は DNA アレイと一塩基多型の検出方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、一塩基多型をより正確に検出することでの 10 きる DNA アレイと、この DNA アレイを用いた一塩基多型の検出方法に関するものである。

背景技術

15

ポストゲノムの時代を迎え、ヌクレオチド配列中の塩基種を正確に、効率よく、さらには低成本で検出するための新しい技術が求められている。例えば、SNP (Single Nucleotide Polymorphism:一塩基多型) はヒトゲノムに約 0.1% (約 1000 塩基に一塩基) の割合で存在する最も頻度の高い多型である。すなわち、20 この一塩基多型とは、ゲノム遺伝子の一塩基が他の塩基に置換することによって、例えば野性型が G-C 塩基対であるのに対し、多型形態では A-T 塩基対となっている状態を意味する。また二媒体染色体のそれぞれの対立遺伝子が多型形態である場合 (ホモ接合型多型形態) と、一方が野性型、他方が多型形態である場合 (ヘテロ接合型多型形態) とが存在する。

25

このような一塩基の変異は、例えばコドン変異による変異アミノ酸の合成 (ミスセンス変異) や終止コドンの生成による不完全タンパク質の合成 (ナンセンス変異) を生じさせる場合がある。従って、SNP の有無が様々な疾病にも関連することが明らかになりつつあり (例えば肺癌に関する p53 遺伝子の SNP : 非特許文献 1) 、診断や遺伝的治療法等を目的として SNP の有無を正確に判定する

こと（SNP タイピング）の重要性が強く認識されてきている。また、この SNP は疾患易罹患性や薬剤反応性に関連する遺伝子を探索する際の有用な多型マーク 5 でもあり、テーラーメイド医療のための重要な遺伝子情報としても注目されている。

SNP タイピングの方法としては、「ハイブリダイゼーション効率を利用した方法」、「酵素認識効率を利用した方法」、「電気的手法を利用した方法」等が知られているが、特にハイブリダイゼーション効率を利用した方法は、DNA アレイ（例えば特許文献 1-4、非特許文献 2、3 参照）への適用が様々に検討され 10 ており、例えば非特許文献 4 には DNA アレイを用いた BRCA1 遺伝子 SNP の検出例が報告されている。

この SNP 検出用の DNA アレイは、例えば、標的遺伝子の野性型配列に相補的な第 1 プローブスポットと、その遺伝子の一塩基多型配列に相補的な第 2 プローブスポットとを固相基体上に配置している。そして、SNP の検出に当たっては、蛍光標識プライマーを用いた PCR 増幅等の手段によって調製された標的遺伝子 cDNA をこの DNA アレイに接触させる。標的遺伝子が野性型の場合、その標識 cDNA は第 1 プローブにハイブリダイズし、第 1 プローブのスポットからのみ蛍光シグナルが得られる（ホモ接合型野性型形態）。一方、標的遺伝子の両方の対立遺伝子が SNP の場合には、第 2 プローブスポットのみから蛍光シグナルが得られ（ホモ接合型 SNP 形態）、一方の対立遺伝子が SNP の場合には、第 1 プローブスポットと第 2 プローブスポットとの両方に同程度の蛍光シグナルがえられる（ヘテロ接合型 SNP 形態）。

- 25 特許文献 1： 米国特許第 5,474,796 号明細書
特許文献 2： 米国特許第 5,605,662 号明細書
特許文献 3： 国際公開第 95/251116 号パンフレット
特許文献 4： 国際公開第 95/35505 号パンフレット
非特許文献 1： Biros et al. Neoplasma 48(5):407-11, 2001
30 非特許文献 2： Schena, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:10614-

10619, 1996

非特許文献 3 : Heller, R. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155, 1997

非特許文献 4 : Hacia JG et al. Nat. Genet. 14:441-447, 1996

5

発明の開示

DNA アレイを用いた SNP 検出では、それぞれのプローブスポットの蛍光シグナルを指標として明確に野性型形態、ホモ接合型 SNP 形態、ヘテロ接合型 SNP 形態を区別することは容易ではない。すなわち、野性型遺伝子と多型遺伝子のそれに由来する標識 cDNA は一塩基のみの違いである。従って、野性型 cDNA の多くはそれに完全に相補的な野性型プローブ（第 1 プローブ）にハイブリダイズするが、一部は一塩基が異なる第 2 プローブにもハイブリダイズする。同様に多型 cDNA も一部は第 1 プローブにもハイブリダイズする。そこで DNA アレイによる SNP 検出は、第 1 プローブスポットと第 2 プローブスポットのそれぞれの蛍光シグナルを比較することによって行われるが、両者のシグナル強度の比較が困難な場合があり、結果として誤った SNP 判定を行ってしまうという不都合が存在した。

20

そこでこの出願の発明は、より正確な SNP 検出を可能とする DNA アレイと、この DNA アレイを用いた SNP 検出方法を提供することを課題としている。

さらにこの出願の発明は、DNA アレイを用いた SNP 検出において、より正確な検出を可能とするプローブ長を決定する方法と、この方法により決定された特定長のプローブを備えた DNA アレイを提供することを課題としている。

この出願の発明者らは、SNP 検出の対象となる被験遺伝子毎に、SNP 形態を正確に判定するための最適標識シグナルを得ることのできるプローブ長が異なることを見出してこの発明を完成させた。

この出願は、前記の課題を解決するための第 1 の発明として、遺伝子の一塩基多型を検出するための DNA アレイであって、遺伝子ポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列部分が遺伝子の第 1 の多型形態に正確に相補的である 1 以上のプローブからなる第 1 のプローブスポット群と、同配列部分が遺伝子の第 2 の多型形態に正確に相補的である 1 以上のプローブからなる第 2 のプローブスポット群とを固相基体上に有し、第 1 プローブスポット群と第 2 プローブスポット群のそれぞれを構成するプローブスポットは、プローブスポット毎にプローブの長さが異なる、ことを特徴とする DNA アレイを提供する。

10

この第 1 発明の DNA アレイにおいては、第 1 プローブスポット群と第 2 プローブスポット群は、それぞれ、2~10 のプローブスポットからなることを好ましい態様としている。

15 またこの第 1 発明の前記態様においては、2~10 のプローブスポットが、そのプローブの長さの順に配置されていることを好ましい態様としている。

この出願は、第 2 の発明として、前記第 1 発明の DNA アレイを少なくとも含む、遺伝子の一塩基多型を検出するためのキットを提供する。

20

この出願は、第 3 の発明として、前記第 1 発明の DNA アレイを用いて遺伝子の一塩基多型を検出する方法であって、以下のステップ：

(a) 被験遺伝子から、標識ポリヌクレオチドを調製するステップ；

(b) 標識ポリヌクレオチドをプローブ付固相基体に接触させるステップ；

25 (c) DNA アレイ上のプローブにハイブリダイズした標識ポリヌクレオチドより得られるシグナルを測定するステップ；

を含むことを特徴とする一塩基多型の検出方法を提供する。

この第 3 発明の方法においては、前記ステップ(c)において測定された、前記

30 第 1 のプローブスポット群と前記第 2 のプローブスポット群のそれぞれのシグ

ナルを比較することをさらに好ましい態様としている。

この出願は、第4の発明として、前記第1発明のDNAアレイを用いて、遺伝子の一塩基多型を検出するための適切なプローブ長を決定する方法であって、以下
5 のステップ：

- (a) 被験遺伝子から、標識ポリヌクレオチドを調製するステップ；
- (b) 標識ポリヌクレオチドをDNAアレイに接触させるステップ；
- (c) DNAアレイ上の各プローブに結合した標識ポリヌクレオチドの標識シグナルを測定し、

10 以下の基準：

- (i) 被験遺伝子がホモ接合性第1多型形態の場合に第1のプローブスポット群に標識シグナルが観察されること、
- (ii) 被験遺伝子がホモ接合性第2多型形態の場合に第2のプローブスポット群に標識シグナルが観察されること、
- 15 (iii) 被験遺伝子がヘテロ接合性多型形態の場合に第1のプローブスポット群と第2のプローブスポット群とに同程度の標識シグナルが観察されること、を満たすプローブスポットのプローブ長を、その遺伝子の一塩基多型を検出するための適切なプローブ長と決定することを特徴とする方法を提供する。

20 さらにこの出願は、第5の発明として、遺伝子の一塩基多型を検出するためのDNAアレイであって、遺伝子ポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列部分が遺伝子の第1の多型形態に正確に相補的である1以上のプローブからなる第1のプローブスポットと、同配列部分が遺伝子の第2の多型形態に正確に相補的である1以上のプローブからなる第2のプローブスポットとを固相基体上
25 に有し、第1および第2のプローブスポットを構成するプローブ長が、前記第4発明の方法で決定された長さであるDNAアレイを提供する。

第1発明のDNAアレイは、様々な1塩基多型形態に対してより正確にハイブリダイズすることのできる様々なプローブ長からなるプローブスポットを備えて
30 いる。従って、この第1発明のDNAアレイを用いた第3発明の方法によって、

より正確な SNP 検出が可能となる。

また第 4 発明の方法によって、SNP 検出の対象となる遺伝子毎に適切なプローブ長が決定される。そして、この方法によって、各遺伝子の SNP 検出に適したプローブ長からなるプローブスポットを含む第 5 発明の DNA アレイが提供される。
5

なおこの出願の発明において、「一塩基多型」とは例えば遺伝子データベース等に登録された遺伝子配列とは異なる一塩基変異を有する場合を言う。従って、
10 データベース等に登録された遺伝子配列が必ずしも野性型（正常型）を意味するわけではなく、また一塩基変異を有する遺伝子が変異遺伝子であるわけでもない。ただし、一塩基の変異が疾患等に関連することが知られている遺伝子については、野性型を「正常型」、一塩基多型を「変異型」と定義することもできる。この出願の発明においては、従って、遺伝子の「第 1 の多型形態」と「第 2 の多型形態」とは、基本的に「野性型」および「変異型」を意味するものではなく、以下の説明では、第 1 の多型形態はデータベース等に登録されている遺伝子配列の形態、第 2 の多型形態は第 1 多型形態の配列中の一塩基が他の塩基に置換した配列からなる形態と定義する。
15

この出願の発明における「遺伝子ポリヌクレオチド」とは、具体的には、SNP 検出の対象となる遺伝子のゲノム DNA、ゲノム DNA から転写された mRNA、または mRNA から合成された cDNA を意味する。またこのポリヌクレオチドは、複数のヌクレオチド、好ましくは 30 以上、より好ましくは 50 以上のヌクレオチドが結合した分子である。
20

この出願の各発明における具体的構成は、発明の実施形態の説明や実施例において詳しく説明する。またこの発明に係る用語や概念は、特別に規定したものを受け、当該技術分野において通常使用されている範囲のものである。さらにこの発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。
25
30

例えば、遺伝子工学および分子生物学的技術は Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995 等に記載され
5 ている。

図面の簡単な説明

10 図 1 は、この発明の DNA アレイの構成例を示した模式図である。

図 2 はこの発明の DNA アレイの別の構成例を示した模式図である。

15 図 3 は、この発明の DNA アレイを用いて遺伝子 GNB3 の SNP を検出した例
を示した蛍光画像である。

図 4 は、この発明の DNA アレイを用いて遺伝子 MTHFR の SNP を検出した
例を示した蛍光画像である。

20 図 5 は、この発明の DNA アレイを用いて遺伝子 CYP 2C19-2 および CYP
2C19-3 のそれぞれの SNP を検出した例を示した蛍光画像である。

発明を実施するための最良の形態

25

第 1 発明の DNA アレイは、1 以上のプローブからなる第 1 のプローブスポット群と、同じく 1 以上のプローブからなる第 2 のプローブスポット群とを固相基体上に有している。第 1 のプローブスポット群を構成する各プローブは、解析対象となる遺伝子ポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列部分が、同遺伝
30 子の第 1 の多型形態に正確に相補的であり、第 2 のプローブスポット群を構成

する各プローブは、同遺伝子ポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列部分が、同遺伝子の第 2 の多型形態に正確に相補的である。そして、第 1 プローブスポット群と第 2 プローブスポット群のそれぞれを構成するプローブスポットは、それぞれ長さの異なるプローブによって構成されている。

5

さらに詳しくは、「プローブスポット」とは、1 以上、好ましくは $10^3 \sim 10^{13}$ 個の同一プローブ（同一配列、同一長のプローブ）の集団が他のプローブスポットと分離されて存在する領域を言う。「プローブスポット群」とは、同一配列で、かつ長さの異なるプローブからなるプローブスポットの集団を意味する。この集団は、一つの好ましい態様として、2~10 のプローブスポットからなる集団である。またこれらのプローブスポットは、それを構成するプローブの長さの順に整列配置されていることを好ましい態様としている。以下、このように整列配置されているプローブスポット群を「プローブスポット列」と記載することがある。さらに、第 1 プローブスポット列と第 2 プローブスポット列は、互いに同一プローブ長からなるプローブスポットが相対向してもよい。

図 1 は、第 1 発明の DNA アレイの構成例である。この第 1 図の例では、第 1 プローブスポット（黒丸）の列と、第 2 プローブスポット（白丸）の列は、それぞれ 8 個のプローブスポットによって構成されている。また、各プローブスポットは、それぞれに含まれるプローブが長→短の順に 1~8 段目までに整列配置されている。すなわち、第 1 段目の第 1 プローブスポット列と第 2 プローブスポット列のそれぞれを構成するプローブは n 個のヌクレオチドであり (n mer)、以下第 2 段目スポットのプローブから順に、 $n-1$ mer、 $n-2$ mer、 $n-3$ mer、 $n-4$ mer、 $n-5$ mer、 $n-6$ mer、 $n-7$ mer である。この場合の「 n 」は 10 ~100 程度、好ましくは 20~50 程度である。

「長さの順番」は長→短の順番であってもよく、短→長の順番であってもよい。また、プローブ長の違いは 1 塩基づつの違いでもよく、あるいは 2 または 3 塩基づつの違いであってもよい。さらに、この図 1 の例では第 1 プローブスポット列と第 2 プローブスポット列のそれぞれのスポットを縦方向（上から下）に

配置しているが、横方向（右から左）に配置してもよい。

さらにまた、同一プローブ（同一配列、同一長のプローブ）からなるプローブスポット 2~5 個程度を整列配置するようにしてもよい。例えば、図 2 は、第 1
5 プローブスポット列と第 2 プローブスポット列の各段には、同一プローブからなる 3 個のプローブスポットがそれぞれ並列配置されている。すなわち、同一プローブからなる複数個のプローブスポットの存在によって、個々のプローブスポットに含まれるプローブ数に若干の変動による影響を排除することができる。

10 第 1 発明の DNA アレイは、以上のとおりのプローブスポット群（好ましくはプローブスポット列）を配置することを除き、通常の DNA アレイと同様にして作製することができる。DNA アレイの作製方法としては、固相担体表面で直接プローブを合成する方法（オン・チップ法）と、予め調製したプローブを固相基体表面に固定する方法とが知られているが、この発明の DNA アレイは後者の方
15 法で作製することが好ましい。予め調製したプローブを固相基体表面に固定する場合には、官能基を導入したプローブを合成し、表面処理した固相基体表面にプローブを点着し、共有結合させる（例えば、Lamture, J.B. et al. Nucl. Acids Res. 22:2121-2125, 1994; Guo, Z. et al. Nucl. Acids Res. 22:5456-5465, 1994）。プローブは、一般的には、表面処理した固相基体にスペーサーやクロ
20 スリンカーを介して共有結合させる。ガラス表面にポリアクリルアミドゲルの微小片を整列させ、そこにプローブを共有結合させる方法（Yershov, G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4913, 1996）、あるいはポリ L-リジンを被覆した固相基体にプローブを結合する方法（特開 2001-186880 号公報）も知
25 られている。また、シリカマイクロアレイ上に微小電極のアレイを作製し、電極上にはストレプトアビジンを含むアガロースの浸透層を設けて反応部位とし、この部位をプラスに荷電させることでビオチン化プローブを固定し、部位の荷電を制御することで、高速で厳密なハイブリダイゼーションを可能にする方法も知
30 られている（Sosnowski, R.G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1119-1123, 1997）。この発明の DNA アレイは、以上のいずれの方法によっても作製することができる。また、プローブを固相基体表面に滴下させてスポットティングを行

う場合には、ピン方式（例えば米国特許第 5,807,5223 号）によって行うことでもできるが、特開 2001-116750 号公報や特開 2001-186881 号公報に開示されているインクジェット方式を採用することが、均一で一定形状のスポット形成のために好ましい。また、このインクジェット方式では、個々のプローブスポットに含まれるプローブ数を等しくすることができるため、プローブ長の違いによるハイブリダイゼーションの違いを正確に測定することができる。さらに、特開 2001-186880 号公報に開示されているような、スポットティング重ね打ちを行うこと、あるいは WO 03/038089 A1 号パンフレットに開示された組成からなるプローブ溶液（保湿性物質を含む溶液）を使用することも、好ましいスポット形成のために推奨される。
10

スポットティングの後は、冷却、スポットに対する水分付加（湿度～80%程度に一定時間保持）、焼成乾燥による固定化処理等を行うことによって、各スポットを固相基体上に固定するし、DNA アレイを完成することができる。

15 なお、DNA アレイの固相基体は、通常の DNA アレイに使用されるガラス（スライドガラス）の他、プラスチック、シリコーン、セラミック等を使用することもできる。

20 第 2 発明は、前記の DNA アレイを含むことを特徴とする一塩基多型検出用のキットである。このキットは、例えば、DNA アレイ、プライマー、PCR 緩衝液、dNTP、MgCl₂、Taq DNA ポリメラーゼ等によって構成することができる。

25 第 3 発明の方法は、前記第 1 発明の DNA アレイを用いて遺伝子の一塩基多型を検出する方法であって、以下のステップを必須として含むことを特徴としている。

- (a) 被験遺伝子から、標識ポリヌクレオチドを調製するステップ。
 - (b) 標識ポリヌクレオチドをプローブ付固相基体に接触させるステップ。
 - (c) DNA アレイ上のプローブにハイブリダイズした標識ポリヌクレオチドより得られるシグナルを測定するステップ。
- 30

- ステップ(a)における被験遺伝子は、SNP の存在が知られている遺伝子であり、その標識ポリヌクレオチドは、例えば既存の SNP データベース（例えば http://SNP.ims.u-tokyo.ac.jp/index_ja.html）等で公開されているプライマ
5 セットを用いて、被験者から単離したゲノム遺伝子またはトータル RNA からの PCR 産物 (cDNA) として調製することができる。この PCR 増幅の際に、標識プライマー（例えばシアニン系有機色素；Cy3、Cy5 などを結合したプライマー）を取り込ませて標識ポリヌクレオチドとする。
- 10 ステップ(b)では、標的ヌクレオチド配列を DNA アレイに接触させ、DNA アレイのプローブにハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションは、96 穴もしくは 384 穴プラスチックプレートに分注した標識ポリヌクレオチド水性液を、DNA アレイ上に点着することによって実施することができる。点着の量は、1～100 nL 程度とすることができます。ハイブリダイゼーションは、室温～70°C の温度範囲で、1～20 時間の範囲で実施することが好ましい。ハイブリダイゼーション終了後、界面活性剤と緩衝液との混合溶液を用いて洗浄を行い、未反応の標識ポリヌクレオチドを除去する。界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム
15 (SDS) を用いることが好ましい。緩衝液としては、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等を用いることができるが、
20 クエン酸緩衝液を用いることが好ましい。

そして、ステップ(c)において、プローブにハイブリダイズした標識ポリヌクレオチドより得られるシグナルを測定する。そして、得られたシグナルから、例えば、以下のとおりに SNP を検出する。

- 25 まず、得られたシグナルのカットオフ値を 20,000 とし、第 1 プローブスポット群と第 2 プローブスポット群の少なくともどちらか一方のシグナルが、20,000 以上の部分の第 1 プローブスポット群と第 2 プローブスポット群のシグナル比（第 1 / 第 2）を算出し、
30 (1) シグナル比が >5 の時は被験遺伝子をホモ接合性第 1 多型形態と判定する。

- (2) シグナル比が<0.2 の時は被験遺伝子をホモ接合性第 2 多型形態と判定する。
- (3) さらに、シグナル比が 0.2 以上 5 以下の時は被験遺伝子をヘテロ接合性多型形態と判定する。

5

更に別の判定方法としては、図 1 に例示した DNA アレイを用いた場合に、第 1 プローブスポット列を構成する 8 個のスポット全てにシグナルが観察され、第 2 プローブスポット列を構成する 4 個のスポットにシグナルが観察された場合には、前記(1)に該当し、この被験遺伝子はホモ接合型第 1 多型形態と判定される。

10 あるいはまた、第 1 プローブスポット列と第 2 プローブスポット列のそれぞれから同数のシグナルスポットが得られた場合であっても、第 1 プローブスポット列のシグナルスポットのシグナル強度の総和が第 2 プローブスポット列のそれより多い場合には、前記(1)に該当し、この被験遺伝子はホモ接合型第 1 多型形態と判定される。

15

また前記(3)の判定基準は、シグナルスポットの数が同一であり、それぞれのシグナル強度の総和が 30% 以下、好ましくは 20% 以下、より好ましくは 10% 以下である場合とすることもできる。

20 すなわち、従来方法では、それぞれ単一の第 1 プローブスポットと第 2 プローブスポットのシグナル強度の多寡を比較するのに対し、この第 3 発明の方法では、それぞれ複数個のスポットからなるプローブスポット群からより多くのシグナルを発するスポット数を測定し、それを比較する。これによって、従来方法に比べてはるかに高精度で SNP を検出することが可能となる。

25

なお、第 3 発明における標識ポリヌクレオチドの調製や、ハイブリダイゼーション手続等は、例えば特開 2001-095574 号公報を初め、多くの特許文献、非特許文献に記載されており、それらの文献記載の方法を適宜に採用して行うことができる。

30

第 4 発明の方法は、前記第 1 発明の DNA アレイを用いて、各遺伝子の一塩基多型を検出するための適切なプローブ長を決定する方法である。具体的には、前記第 3 発明の方法で SNP を検出する際に最も適したプローブ長、すなわち、それぞれの 1 塩基多型形態を最も正確に反映することのできるプローブ長が、この第 4 発明において決定されるプローブ長となる。従って、被験者の SNP 検出を目的とした第 3 発明の方法によって得られるデータから、適切なプローブ長を得ることができる。

そして、各遺伝子について適切なプローブ長からなるプローブスポットをそれぞれに備えた第 5 発明の DNA アレイが提供される。この第 5 発明の DNA アレイは、一つの被検遺伝子に対して、それぞれ「一つ」の第 1 プローブスポットと第 2 プローブスポットを備えている。それぞれのプローブスポットを構成するプローブは、その遺伝子の SNP を検出するための最適の長さである。従って、この第 5 発明の DNA アレイは、第 1 発明の DNA アレイと比較してはるかに多くの遺伝子の SNP 検出を対象とするプローブスポットを備えることができ、しかも SNP 検出制度は第 1 発明の DNA アレイと実質的に同一である。

実施例

20

以下、実施例を示してこの出願の発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

25

実施例 1

(1) DNA アレイの作成

遺伝子 GNB3、MTHFR のそれぞれのポリヌクレオチド (cDNA) にハイブリダイズする配列部分がそれぞれの遺伝子の第 1 多型形態に正確に相補的である 30 第 1 プローブ、同じく配列部分が第 2 多型形態に正確に相補的である第 2 プロ

ープを、それぞれ 1 塩基異なる長さで合成した。各プローブの塩基配列は、遺伝子 GNB3 用の第 1 プローブ (GNB3C-01~08) は SEQ ID No. 1-8、第 2 プローブ (GNB3T-01~08) は SEQ ID No. 9-16、遺伝子 MTHFR 用の第 1 プローブ (MTHFRC-01~08) は SEQ ID No. 17-24、第 2 プローブ (MTHFRT-01 ~08) は SEQ ID No. 25-32 である。また、SEQ ID Nos. 1-32 の各塩基配列の 5' 側には塩基配列「TTTTT」が連結されている。

これらのプローブの 5' をアミノ基で修飾し、オリゴ DNA 固定化用工ポキシガラス基板に、1 スポット当たり、50pmol/μL の溶液を 200pL ずつスポットティングした。また、第 1 プローブスポット列と第 2 プローブスポット列の構成は、図 2 に示したように、同一プローブからなるプローブスポットを 3 個づつ並列配置した。

スポットティング後、42℃、相対湿度 50% の条件下で一晩インキュベートした。次に、0.2% SDS 水溶液で室温にて 2 分間洗浄し、さらに滅菌水で室温にて 1 分間の洗浄を 2 回行った。最後に 50℃ の滅菌水中で 20 分間インキュベーした後、遠心器で 1000rpm×5 分間遠心し、乾燥した。

(2) 標識ポリヌクレオチドの調製

遺伝子型が判明している被験者血液から抽出した DNA をテンプレートとし、以下の PCR 条件で増幅を行い、標識ポリヌクレオチドを調製した。

- 20 • プライマー 1 : 5pmol (5' 末端 Cy3 標識)
- プライマー 2 : 5pmol
- ×10 緩衝液 : 2.5 μl
- 2 mM dNTP : 2.5 μl
- 25 mM MgCl₂ : 2.5 μl
- 25 • Taq DNA ポリメラーゼ : 1U
- 抽出 DNA 溶液 : 20 ng
- 増幅条件

94℃ / 5 分

94℃ / 30 秒、60℃ / 30 秒、72℃ / 30 秒 (35 サイクル)

30 72℃ / 2 分

(3) ハイブリダイゼーション

前記(2)で調製した標識ポリヌクレオチドを 0.3 N NaOH (終濃度) と混合し、一本鎖に変性した後、200 mM クエン酸-リン酸緩衝液 (pH6.0) 、2% SDS、
5 750 mM NaCl、0.1% NaN₃ (全て終濃度) を添加、混合し、サンプルとした。

次に、前記(1)で作製した DNA アレイ上にハイブリダイゼーションサンプルを滴下し、カバーガラスをかけ、55°C、相対湿度 100% のモイスチャーチャンバー内で一晩インキュベートを行った。反応後、カバーガラスをはずし、あらかじめ 55°C に加温した 2×SSC、1% SDS 水溶液に、55°C で 20 分間浸漬した。
10 次に 50 mM Tris-HCl (pH7.5) 、0.025% Tween20 水溶液に 15 分間浸漬した後、遠心器で 1000 rpm で 5 分間遠心し、乾燥した。

(4) シグナル測定

Scan Array (Packard BioScience 社製) にて、レーザーパワー 100%、フォトマル 100% で蛍光画像を測定した。得られた画像は図 3、4 に示したとおりである。また、得られた画像シグナルを GenePix Pro (Axon 社製) にて数値化した (表 1-3)。

蛍光シグナルのカットオフ値を 20,000 とし、第 1 プローブと第 2 プローブの少なくともどちらか一方の蛍光シグナルが 20,000 以上の部分の第 1 プローブ
20 と第 2 プローブの蛍光シグナル比 (第 1 / 第 2) を算出した。蛍光シグナル比が >5 の時はホモ接合型第 1 多型形態、<0.2 の時はホモ接合型第 2 多型形態、0.2 以上 5 以下の時はヘテロ接合性多型形態と判定したところ、事実と一致したことことが確認できた。

表 1

プローブ名	シグナル平均値	プローブ名	シグナル平均値
GNB3C-01	58708	GNB3T-01	53770
GNB3C-02	59917	GNB3T-02	61692
GNB3C-03	51209	GNB3T-03	62803
GNB3C-04	58654	GNB3T-04	26074
GNB3C-05	59910	GNB3T-05	12235
GNB3C-06	49292	GNB3T-06	4232
GNB3C-07	11455	GNB3T-07	287
GNB3C-08	7982	GNB3T-08	-
MTHFRC-01	52477	MTHFRT-01	49964
MTHFRC-02	28938	MTHFRT-02	37235
MTHFRC-03	24547	MTHFRT-03	682
MTHFRC-04	23134	MTHFRT-04	402
MTHFRC-05	19816	MTHFRT-05	1895
MTHFRC-06	9657	MTHFRT-06	540
MTHFRC-07	1103	MTHFRT-07	327
MTHFRC-08	-	MTHFRT-08	-

表 2

プローブ名	シグナル平均値	プローブ名	シグナル平均値
GNB3C-01	43057	GNB3T-01	54237
GNB3C-02	48372	GNB3T-02	51780
GNB3C-03	49170	GNB3T-03	46744
GNB3C-04	46289	GNB3T-04	48697
GNB3C-05	39406	GNB3T-05	52358
GNB3C-06	35536	GNB3T-06	43055
GNB3C-07	6042	GNB3T-07	8489
GNB3C-08	2768	GNB3T-08	216
MTHFRC-01	63347	MTHFRT-01	53418
MTHFRC-02	54415	MTHFRT-02	59295
MTHFRC-03	43163	MTHFRT-03	15571
MTHFRC-04	28148	MTHFRT-04	16884
MTHFRC-05	24618	MTHFRT-05	25909
MTHFRC-06	9163	MTHFRT-06	8836
MTHFRC-07	2727	MTHFRT-07	-
MTHFRC-08	-	MTHFRT-08	-

表 3

プローブ名	シグナル平均値		プローブ名	シグナル平均値
GNB3C-01	58342		GNB3T-01	61200
GNB3C-02	54327		GNB3T-02	60863
GNB3C-03	8830		GNB3T-03	59395
GNB3C-04	1245		GNB3T-04	61301
GNB3C-05	-		GNB3T-05	40213
GNB3C-06	-		GNB3T-06	19563
GNB3C-07	-		GNB3T-07	2692
GNB3C-08	-		GNB3T-08	640
MTHFRC-01	25461		MTHFRT-01	63825
MTHFRC-02	10030		MTHFRT-02	54577
MTHFRC-03	2625		MTHFRT-03	34217
MTHFRC-04	1333		MTHFRT-04	46260
MTHFRC-05	626		MTHFRT-05	54278
MTHFRC-06	229		MTHFRT-06	37178
MTHFRC-07	-		MTHFRT-07	6861
MTHFRC-08	-		MTHFRT-08	979

実施例 2

5

実施例 1 と同様にして、遺伝子 CYP 2C19-2 および CYP 2C19-3 のそれぞれの遺伝子多型を検出試験した。各プローブの塩基配列は、遺伝子 CYP 2C19-2 用の第 1 プローブ (CYP 2C19-2-G-01~05) は SEQ ID No. 33-37、第 2 プローブ (CYP 2C19-2-A-06~010) は SEQ ID No. 38-42、遺伝子 CYP 2C19-3 の第 1 プローブ (CYP 2C19-3-G-01~05) は SEQ ID No. 43-47、第 2 プローブ (CYP 2C19-3-A-06~010) は SEQ ID No. 48-52 である。また、SEQ ID Nos. 33-52 の各塩基配列の 5' 側には塩基配列「TTTTT」が連結されている。

これらのプローブを実施例(1)と同様にしてエポキシガラス基板に固定し、DNA マイクロアレイを作成した。なお、遺伝子 CYP 2C19-2 および CYP 2C19-3 のそれぞれのマイクロアレイ構成は図 5 の左欄に示したとおりである。すなわち、CYP 2C19-2 用アレイの場合には、①~⑤が第 1 プローブスポット列、⑥~⑩が第 2 プローブスポット列である。また、CYP 2C19-3 用アレイの

場合には、⑪～⑯が第1プローブスポット列、⑯～㉑が第2プローブスポット列である。

標識ポリヌクレオチドの調製、ハイブリダイゼーション、シグナル測定はそれぞれ実施例1と同様にして行った。

5

得られた蛍光画像は図5に示したとおりである。また、得られた画像シグナルを数値化した結果は表4(CYP 2C19-2)および表5(CYP 2C19-3)に示したとおりである。実施例1と同様に蛍光シグナル比(第1/第2)を算出し、蛍光シグナル比が>5の時はホモ接合型第1多型形態、<0.2の時はホモ接合型第2多型形態、0.2以上5以下の時はヘテロ接合性多型形態と判定したところ、事実と一致したことが確認された。

表4

Major					
	プローブ名	シグナル値	プローブ名	シグナル値	シグナル比
①	CYP 2C19-2-G-01	64465	⑥ CYP 2C19-2-A-06	64895	1.0
②	CYP 2C19-2-G-02	64984	⑦ CYP 2C19-2-A-07	65023	1.0
③	CYP 2C19-2-G-03	64690	⑧ CYP 2C19-2-A-08	39170	1.7
④	CYP 2C19-2-G-04	65309	⑨ CYP 2C19-2-A-09	13075	5.0
⑤	CYP 2C19-2-G-05	65060	⑩ CYP 2C19-2-A-10	8229	7.9

Hetero					
	プローブ名	シグナル値	プローブ名	シグナル値	シグナル比
①	CYP 2C19-2-G-01	65303	⑥ CYP 2C19-2-A-06	64989	1.0
②	CYP 2C19-2-G-02	64907	⑦ CYP 2C19-2-A-07	64656	1.0
③	CYP 2C19-2-G-03	43602	⑧ CYP 2C19-2-A-08	65083	0.7
④	CYP 2C19-2-G-04	48739	⑨ CYP 2C19-2-A-09	65040	0.7
⑤	CYP 2C19-2-G-05	18641	⑩ CYP 2C19-2-A-10	64823	0.3

Minor					
	プローブ名	シグナル値	プローブ名	シグナル値	シグナル比
①	CYP 2C19-2-G-01	10371	⑥ CYP 2C19-2-A-06	64764	0.2
②	CYP 2C19-2-G-02	8176	⑦ CYP 2C19-2-A-07	64869	0.1
③	CYP 2C19-2-G-03	-	⑧ CYP 2C19-2-A-08	64914	0
④	CYP 2C19-2-G-04	-	⑨ CYP 2C19-2-A-09	64990	0
⑤	CYP 2C19-2-G-05	-	⑩ CYP 2C19-2-A-10	65147	0

表 5

Major					
プローブ名	シグナル値	プローブ名	シグナル値	シグナル比	
⑪ CYP 2C19-3-G-01	28025	⑯ CYP 2C19-3-A-06	23936	1.2	
⑫ CYP 2C19-3-G-02	20753	⑰ CYP 2C19-3-A-07	25290	0.8	
⑬ CYP 2C19-3-G-03	19070	⑱ CYP 2C19-3-A-08	13678	1.4	
⑭ CYP 2C19-3-G-04	23035	⑲ CYP 2C19-3-A-09	8593	2.7	
⑮ CYP 2C19-3-G-05	27720	⑳ CYP 2C19-3-A-10	2952	9.4	

Hetero					
プローブ名	シグナル値	プローブ名	シグナル値	シグナル比	
⑪ CYP 2C19-3-G-01	46011	⑯ CYP 2C19-3-A-06	44044	1.0	
⑫ CYP 2C19-3-G-02	31691	⑰ CYP 2C19-3-A-07	47014	0.5	
⑬ CYP 2C19-3-G-03	34519	⑱ CYP 2C19-3-A-08	28242	0.5	
⑭ CYP 2C19-3-G-04	32234	⑲ CYP 2C19-3-A-09	24735	1.3	
⑮ CYP 2C19-3-G-05	24581	⑳ CYP 2C19-3-A-10	24134	1.0	

Minor					
プローブ名	シグナル値	プローブ名	シグナル値	シグナル比	
⑪ CYP 2C19-3-G-01	-	⑯ CYP 2C19-3-A-06	49587	0	
⑫ CYP 2C19-3-G-02	-	⑰ CYP 2C19-3-A-07	47108	0	
⑬ CYP 2C19-3-G-03	-	⑱ CYP 2C19-3-A-08	18297	0	
⑭ CYP 2C19-3-G-04	-	⑲ CYP 2C19-3-A-09	9378	0	
⑮ CYP 2C19-3-G-05	-	⑳ CYP 2C19-3-A-10	8602	0	

産業上の利用可能性

以上詳しく述べたとおり、この出願の発明は、より正確な SNP 検出を可能とする DNA アレイと、この DNA アレイを用いて正確な SNP 検出を行う方法に関するものである。またこの出願の発明は、SNP 検出の対象となる遺伝子に応じた適切なプローブ長を決定する方法と、この方法により決定されたプローブ長からなるプローブを備えた DNA アレイに関するものである。これらの発明によって、疾患易罹患性や薬剤反応性に関する遺伝子の探索、あるいはテラーメイド医療のための重要な遺伝子情報としての SNP を正確かつ再現性よく検出することが可能となる。

請求の範囲

1. 遺伝子の一塩基多型を検出するための DNA アレイであって、遺伝子
5 ポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列部分が遺伝子の第 1 の多型形態に正
確に相補的である 1 以上のプローブからなる第 1 のプローブスポット群と、同配
列部分が遺伝子の第 2 の多型形態に正確に相補的である 1 以上のプローブからなる
第 2 のプローブスポット群とを固相基体上に有し、第 1 プローブスポット群と
10 第 2 プローブスポット群のそれぞれを構成するプローブスポットは、プローブス
ポット毎にプローブの長さが異なる、ことを特徴とする DNA アレイ。
2. 第 1 プローブスポット群と第 2 プローブスポット群は、それぞれ、2
～10 のプローブスポットからなる請求項 1 の DNA アレイ。
- 15 3. 2～10 のプローブスポットが、そのプローブの長さの順に配置され
ている請求項 2 の DNA アレイ。
4. 請求項 1 から 3 のいずれかの DNA アレイを少なくとも含む、遺伝子
の一塩基多型を検出するためのキット。
- 20 5. 請求項 1 から 3 のいずれかの DNA アレイを用いて遺伝子の一塩基多
型を検出する方法であって、以下のステップ：
 - (a) 被験遺伝子から、標識ポリヌクレオチドを調製するステップ；
 - (b) 標識ポリヌクレオチドをプローブ付固相基体に接触させるステップ；
 - 25 (c) DNA アレイ上のプローブにハイブリダイズした標識ポリヌクレオチドより
得られるシグナルを測定するステップ；
を含むことを特徴とする一塩基多型の検出方法。
- 30 6. 前記ステップ(c)において測定された、前記第 1 のプローブスポット
群と前記第 2 のプローブスポット群のそれぞれのシグナルを比較する請求項 5 の

一塩基多型の検出方法。

7. 請求項 1 から 3 のいずれかの DNA アレイを用いて、遺伝子の一塩基多型を検出するための適切なプローブ長を決定する方法であって、以下のステップ：

- (a) 被験遺伝子から、標識ポリヌクレオチドを調製するステップ；
- (b) 標識ポリヌクレオチドをDNAアレイに接触させるステップ；
- (c) DNAアレイ上の各プローブに結合した標識ポリヌクレオチドの標識シグナルを測定し、

10 以下の中準：

- (i) 駿遺伝子がホモ接合性第 1 多型形態の場合に第 1 のプローブスポット群に標識シグナルが観察されること、
- (ii) 被験遺伝子がホモ接合性第 2 多型形態の場合に第 2 のプローブスポット群に標識シグナルが観察されること、
- 15 (iii) 被験遺伝子がヘテロ接合性多型形態の場合に第 1 のプローブスポット群と第 2 のプローブスポット群とに同程度の標識シグナルが観察されること、
を満たすプローブスポットのプローブ長を、その遺伝子の一塩基多型を検出するための適切なプローブ長と決定することを特徴とする方法。

20 8. 遺伝子の一塩基多型を検出するためのDNAアレイであって、遺伝子ポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列部分が遺伝子の第 1 の多型形態に正確に相補的である 1 以上のプローブからなる第 1 のプローブスポットと、同配列部分が遺伝子の第 2 の多型形態に正確に相補的である 1 以上のプローブからなる第 2 のプローブスポットとを固相基体上に有し、第 1 および第 2 のプローブスポットを構成するプローブ長が、請求項 7 の方法で決定された長さであるDNAアレイ。

図 1

第1プローブ 第2プローブ

スポット

スポット

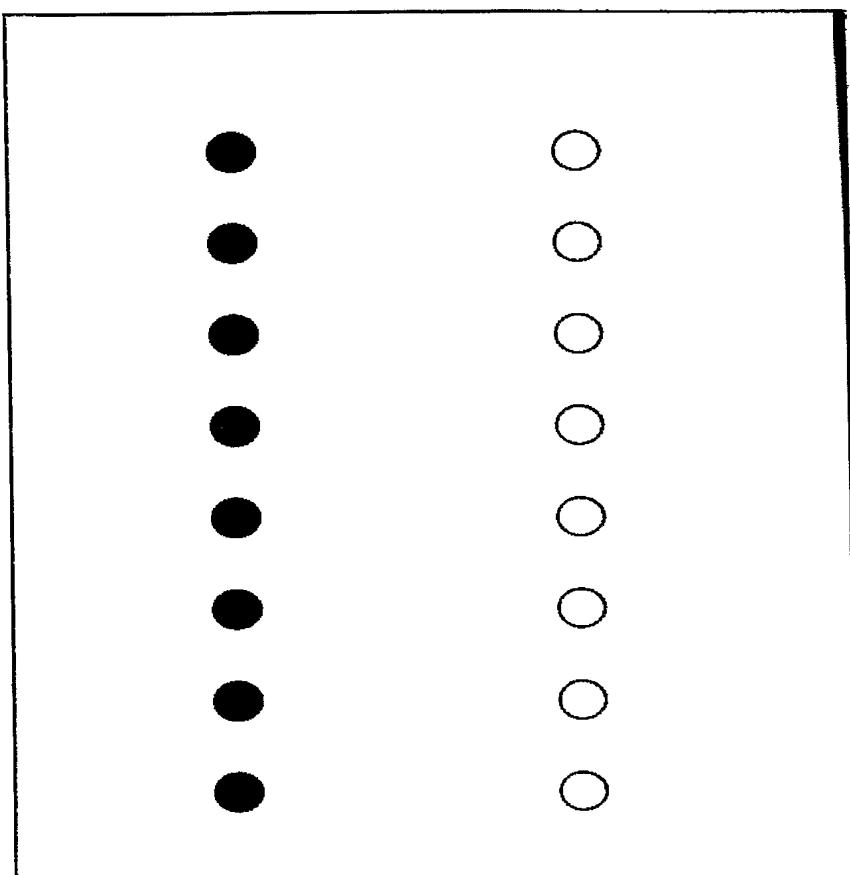
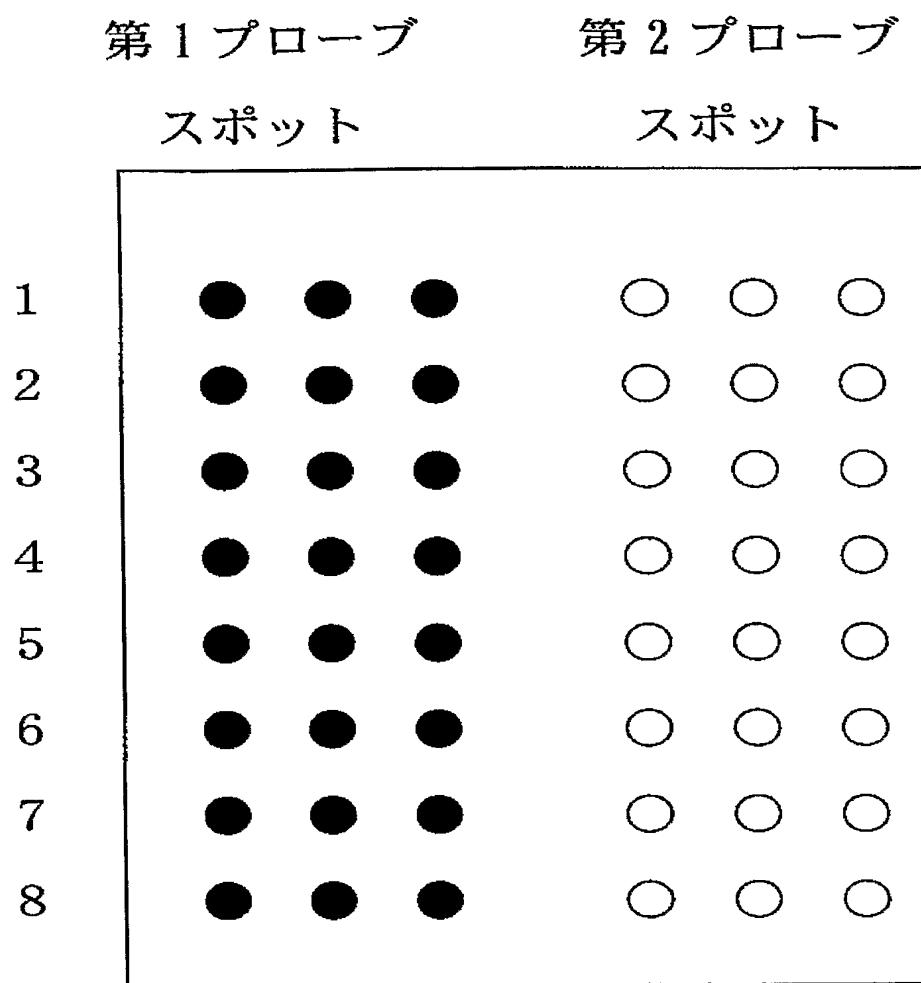
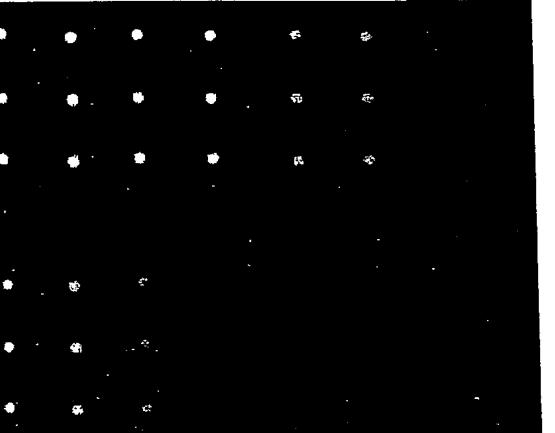
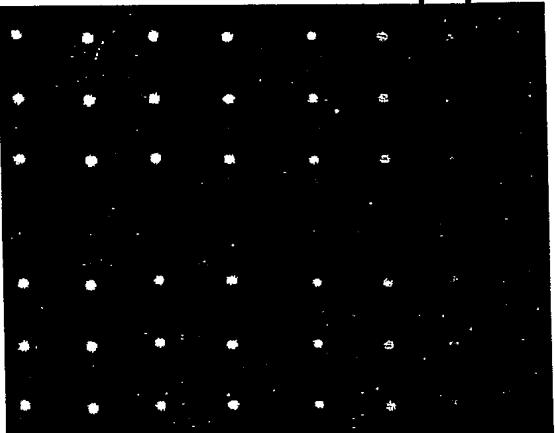
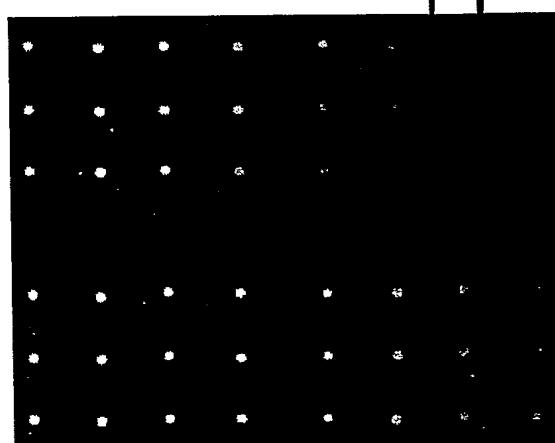
1
2
3
4
5
6
7
8

図 2

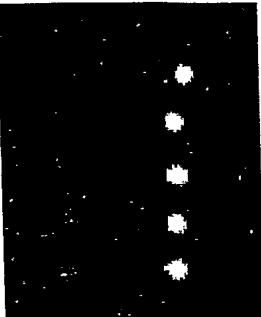
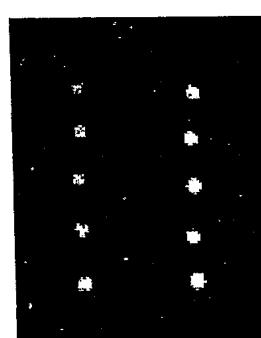
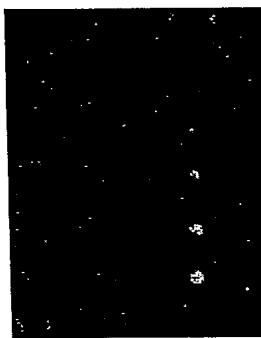
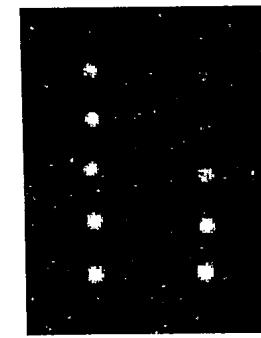
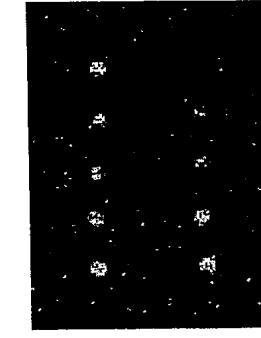
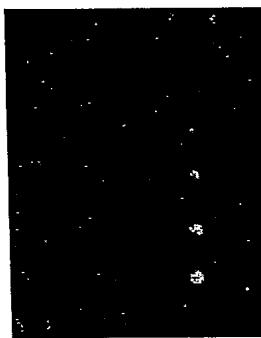
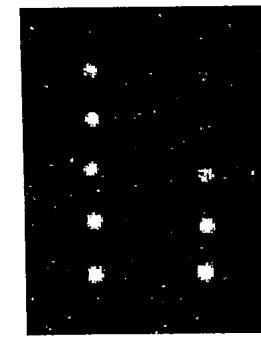
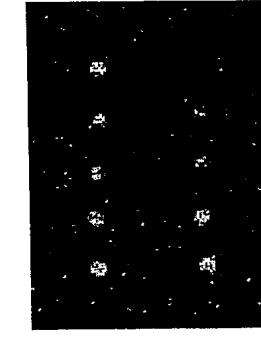
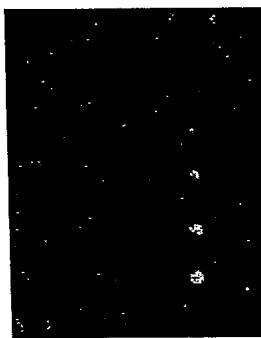
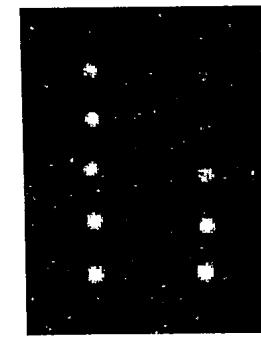
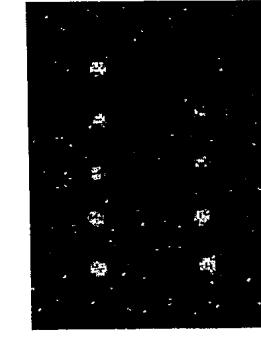
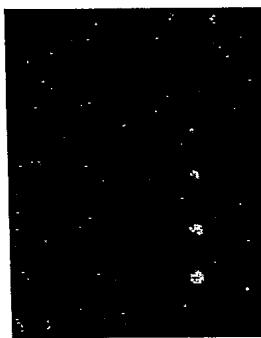


3/5

図 3

Major Homo		Hetero		Minor Homo	
Major	Minor	Major	Minor	Major	Minor
11,000	290	6,000	8,500	-	2,700
					
遺伝子名 : GNB3 ハイブリッド条件 : 55°C、16hr. 測定条件 : Scan Array (100,100)					

5/5

遺伝子名	Major	Hetero	Minor																																
				45	51																														
CYP 2C19-2																																			
Major probe				18641	65147																														
Minor probe				65060	0																														
	<table border="1"><tr><td>①</td><td>②</td><td>③</td><td>④</td><td>⑤</td></tr><tr><td>⑥</td><td>⑦</td><td>⑧</td><td>⑨</td><td>⑩</td></tr></table>	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	<table border="1"><tr><td>⑪</td><td>⑫</td><td>⑬</td><td>⑭</td><td>⑮</td></tr><tr><td>⑯</td><td>⑰</td><td>⑱</td><td>⑲</td><td>⑳</td></tr></table>	⑪	⑫	⑬	⑭	⑮	⑯	⑰	⑱	⑲	⑳	<table border="1"><tr><td>⑪</td><td>⑫</td><td>⑬</td><td>⑭</td><td>⑮</td></tr><tr><td>⑯</td><td>⑰</td><td>⑱</td><td>⑲</td><td>⑳</td></tr></table>	⑪	⑫	⑬	⑭	⑮	⑯	⑰	⑱	⑲	⑳	8229	49587
①	②	③	④	⑤																															
⑥	⑦	⑧	⑨	⑩																															
⑪	⑫	⑬	⑭	⑮																															
⑯	⑰	⑱	⑲	⑳																															
⑪	⑫	⑬	⑭	⑮																															
⑯	⑰	⑱	⑲	⑳																															
CYP 2C19-3																																			
Major probe				24581	24134																														
Minor probe				27720	2952																														
	<table border="1"><tr><td>⑪</td><td>⑫</td><td>⑬</td><td>⑭</td><td>⑮</td></tr><tr><td>⑯</td><td>⑰</td><td>⑱</td><td>⑲</td><td>⑳</td></tr></table>	⑪	⑫	⑬	⑭	⑮	⑯	⑰	⑱	⑲	⑳	<table border="1"><tr><td>⑪</td><td>⑫</td><td>⑬</td><td>⑭</td><td>⑮</td></tr><tr><td>⑯</td><td>⑰</td><td>⑱</td><td>⑲</td><td>⑳</td></tr></table>	⑪	⑫	⑬	⑭	⑮	⑯	⑰	⑱	⑲	⑳	<table border="1"><tr><td>⑪</td><td>⑫</td><td>⑬</td><td>⑭</td><td>⑮</td></tr><tr><td>⑯</td><td>⑰</td><td>⑱</td><td>⑲</td><td>⑳</td></tr></table>	⑪	⑫	⑬	⑭	⑮	⑯	⑰	⑱	⑲	⑳	0	
⑪	⑫	⑬	⑭	⑮																															
⑯	⑰	⑱	⑲	⑳																															
⑪	⑫	⑬	⑭	⑮																															
⑯	⑰	⑱	⑲	⑳																															
⑪	⑫	⑬	⑭	⑮																															
⑯	⑰	⑱	⑲	⑳																															

SEQUENCE LISTING

<110> TOYOB0 Co., Ltd.
NGK Insulators, Ltd.

<120> DNA Array and Method for Detecting Single Nucleotide Polymorphism

<130> 05-F-013PCT

<150> JP2004-81034
<151> 2004-03-19

<160> 52

<210> 1
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 1
GGCATCACGT CCGTGGCCTT CTCCC

25

<210> 2
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 2
GCATCACGTC CGTGGCCTTC TCCC

24

<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 3
GCATCACGTC CGTGGCCTTC TCC

23

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 4
CATCACGTCC GTGGCCTTCT CC

22

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 5
CATCACGTCC GTGGCCTTCT C

21

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 6
ATCACGTCCG TGGCCTTCTC

20

<210> 7
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 7

ATCACGTCCG TGGCCTTCT

19

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 8

TCACGTCCGT GGCCTTCT

18

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 9

GGCATCACGT CTGTGGCCTT CTCCC

25

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 10

GCATCACGTC TGTGGCCTTC TCCC

24

<210> 11

<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 11
GCATCACGTC TGTGGCCTTC TCC 23

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 12
CATCACGTCT GTGGCCTTCT CC 22

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 13
CATCACGTCT GTGGCCTTCT C 21

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 14
ATCACGTCTG TGGCCTTCTC 20

<210> 15
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 15
ATCACGTCTG TGGCCTTCT 19

<210> 16
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 16
TCACGTCTGT GGCCTTCT 18

<210> 17
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 17
GTCTGCGGGGA GCCGATTCA TCATC 25

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 18

GTCTGCGGGGA GCCGATTCA TCAT

24

<210> 19

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 19

TCTGCGGGAG CCGATTTCAT CAT

23

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 20

TCTGCGGGAG CCGATTTCAT CA

22

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 21

CTGCGGGAGC CGATTTCATC A

21

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 22

CTGCGGGAGC CGATTCATC

20

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 23

TGCGGGAGCC GATTCATC

19

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 24

TGCGGGAGCC GATTCAT

18

<210> 25

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 25

GTCTGCGGGA GTCGATTCA TCATC

25

<210> 26
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 26
GTCTGCGGGGA GTCGATTCA TCAT 24

<210> 27
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 27
TCTGCGGGAG TCGATTTCAT CAT 23

<210> 28
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 28
TCTGCGGGAG TCGATTTCAT CA 22

<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 29

CTGCGGGAGT CGATTCATC A

21

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 30

CTGCGGGAGT CGATTCATC

20

<210> 31
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 31

TGCAGGGAGTC GATTCATC

19

<210> 32
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 32

TGCAGGGAGTC GATTCAT

18

<210> 33
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 33

TTTTTGAT TATTCCCGG GAACCCATAA CA

32

<210> 34

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 34

TTTTTGATT ATTTCCCGGG AACCCATAAC A

31

<210> 35

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 35

TTTTTGATT ATTTCCCGGG AACCCATAAC

30

<210> 36

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 36

TTTTGATTA TTTCCCGGGA ACCCATAAC

29

<210> 37

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 37

TTTTGATTA TTTCCGGGA ACCCATAA

28

<210> 38

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 38

TTTTTATTGA TTATTCCCA GGAACCCATA ACAAA

35

<210> 39

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 39

TTTTTATTGA TTATTCCCA GGAACCCATA ACAA

34

<210> 40

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 40

TTTTTTGAT TATTCAG GAACCCATAA CAA

33

<210> 41
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 41
TTTTTGAT TATTCCCAG GAACCCATAA CA 32

<210> 42
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 42
TTTTTGATT ATTTCCCAGG AACCCATAAC A 31

<210> 43
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 43
TTTTTATCAG GATTGTAAGC ACCCCCTGGA TCCA 34

<210> 44
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 44

TTTTTCAGG ATTGTAAGCA CCCCTGGAT CCA

33

<210> 45
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 45
TTTTCAGGA TTGTAAGCAC CCCCTGGATC CA

32

<210> 46
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 46
TTTTAGGAT TGTAAGCACCC CCCTGGATCC A

31

<210> 47
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 47
TTTTGGATT GTAAGCACCC CCTGGATCCA

30

<210> 48
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 48

TTTTCATCA GGATTGTAAG CACCCCTGA ATCCA

35

<210> 49

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 49

TTTTATCAG GATTGTAAGC ACCCCCTGAA TCCA

34

<210> 50

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 50

TTTTTCAGG ATTGTAAGCA CCCCTGAAT CCA

33

<210> 51

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 51

TTTTCAGGA TTGTAAGCAC CCCCTGAATC CA

32

<210> 52

<211> 31

<212> DNA

15/15

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 52

TTTTAGGAT TGTAAGCACC CCCTGAATCC A

31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005612

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/68, G01N37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/68, G01N37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST FILE (JOIS), BIOSIS/MEDLINE/WPIIDS (STN), CAPLUS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-514091 A (Affymetrix, Inc.), 14 May, 2002 (14.05.02), Claims & US 6368799 B1 & EP 1009857 A & WO 98/56954 A1	1-8
A	JP 2003-505038 A (ROSETTA INPHARMATICS, INC.), 12 February, 2003 (12.02.03), Description as a whole & EP 1200625 A & WO 01/6013 A1	1-8
A	ARMSTRONG B. et al., "Suspension arrays for high throughput, multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping.", Cytometry., 2000, Vol.40, No.2, p.102-8.	1-8

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
15 April, 2005 (15.04.05)

Date of mailing of the international search report
10 May, 2005 (10.05.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/09, C12Q1/68, G01N37/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/09, C12Q1/68, G01N37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST ファイル(JOIS) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN) CAPLUS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2002-514091 A(アフィトリックス、インコ-ボーレイテッド) 2002.05.14, CLAIMS & US 6368799 B1 & EP 1009857 A & WO 98/56954 A1	1-8
A	JP 2003-505038 A(ロゼッタ・インファーマティクス・インコ-ボーレイテッド) 2003.02.12 明細書全体 & EP 1200625 A & WO 01/6013 A1	1-8
A	ARMSTRONG B, et. al., " Suspension arrays for high throughput, multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping." Cytometry., 2000, Vol. 40, No. 2, p. 102-8.	1-8

〔C欄の続きにも文献が列挙されている。〕

〔パテントファミリーに関する別紙を参照。〕

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 15.04.2005	国際調査報告の発送日 10.5.2005
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁(I S A / J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 田中 晴絵 電話番号 03-3581-1101 内線 3488 4N 9739